

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Mirka Matějková

Nové regulační metabolické faktory u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu

New regulatory metabolic factors in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus

Bakalářská práce

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 06. 05. 2011

Podpis

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svým rodičům a přítelovi, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia. Velmi také děkuji svému školiteli a všem lidem z laboratoře za jejich čas, ochotu a trpělivost při psaní této práce.

Obsah

1. ÚVOD	3
2. EVOLUČNÍ VÝVOJ - VZNIK PODRODIN FGF.....	5
3. CHARAKTERIZACE FGF 19 A FGF 21 A JEJICH PŮSOBNÍ.....	6
3.1. ENDOKRINNÍ PŮSOBNÍ FGF.....	6
3.2. FGF 15/19	7
3.3. FGF 21	8
4. FYZIOLOGICKÁ ÚLOHA	10
4.1. FGF 15/19	10
4.1.1. <i>Role FGF 15/19 v embryonálním stádiu</i>	10
4.1.2. <i>Působení FGF 19 v játrech při syntéze žlučových kyselin</i>	10
4.1.2.1. Autokrinní působení FGF 19	12
4.1.3. <i>Potlačení syntézy mastných kyselin</i>	13
4.1.3.1. Mechanismus inhibice syntézy mastných kyselin	14
4.1.3.1.1. Mechanismus závislý na SREBP-1c	14
4.1.3.1.2. Mechanismus nezávislý na SREBP-1c.....	14
4.2. FGF 21	15
4.2.1. <i>Působení v játrech</i>	15
4.2.2. <i>Působení v tukové tkáni</i>	17
4.2.3. <i>Působení v pankreatu</i>	19
5. KLINICKÉ STUDIE.....	20
5.1. FGF 19	20
5.2. FGF 21	21
6. ZÁVĚR.....	24
7. SEZNAM ZKRATEK.....	25
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27

Abstrakt

Fibroblastové růstové faktory jsou proteiny, které plní různorodé biologické funkce v metabolismu, regeneraci, diferenciaci buněk a ve vývoji. Lidská FGF genová rodina zahrnuje 22 členů. FGF 19 podrodina obsahuje FGF 19, FGF 21 a FGF 23. Tyto proteiny působí v organismu endokrinním způsobem. Podrodina FGF 19 pro svoje působení vyžaduje klotho protein fungující jako kofaktor. FGF 19 je produkován střevem, ale působí převážně v játrech, kde skrze FGFR4 receptor inhibuje syntézu žlučových a mastných kyselin. FGF 21 produkovaný játry je zapojen do metabolismu sacharidů a lipidů. Sérové hladiny FGF 21 jsou zvýšené u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu, u kterých může působit jako metabolický regulátor utilizace glukózy v adipocytech. Sérové hladiny FGF 19 jsou naopak u obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu sniženy a pravděpodobně závisejí spíše na celkovém nutričním stavu organismu než na metabolismu glukózy a na inzulínové senzitivitě.

Klíčová slova: diabetes mellitus 2. typu, FGF 19, FGF 21, obezita, tuková tkáň

Abstract

Fibroblast growth factors are proteins with diverse biological function in development, tissue repair, and metabolism. The human FGF gene family consists of 22 members. FGF 19 subfamily includes FGF 19, FGF 21, and FGF 23. They act as systemic factors in an endocrine manner. FGF 19 subfamily requires klotho protein as a cofactor for its action. FGF 19 produced by intestine acts mainly in the liver through FGFR4, where it inhibits bile acid and fatty acid synthesis. FGF 21 is produced by the liver and contributes to the regulation of carbohydrate and lipid metabolism through modulation of glucose uptake in adipocytes. Serum FGF 21 levels are increased in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. Serum FGF 19 levels are on the contrary decreased in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus and more probably depend on the nutritional status of the organism than on the glucose metabolism and insulin sensitivity.

Key words: type 2 diabetes mellitus, FGF 19, FGF 21, obesity, adipose tissue

1. Úvod

Prevalence obezity v posledních letech strmě stoupá a tím se tato choroba řadí k nejčastějším onemocněním nejen v České republice, ale prakticky ve všech průmyslově vyspělých zemích světa. Obezita je vnímána jako celosvětový problém nejen z hlediska zdravotnictví, ale má dopad i na ekonomickou sféru, protože náklady na léčbu komplikací obezity výrazně zvyšují celkové náklady zdravotnictví. Obezitou a nadváhou trpí přibližně 55 % světové populace, ovšem různé zdroje dokládají rozlišné procentuální zastoupení. Ke značnému výskytu obezity přispívá i změna životního stylu projevující se výraznou převahou energetického příjmu nad energetickým výdejem díky snížené fyzické aktivitě a nadměrné konzumaci kaloricky bohaté potravy. Obezita není charakteristická pouze pro střední a starší generaci. Její výskyt v posledních letech roste i u dětí a adolescentů.

Obezita je komplexní onemocnění způsobené interakcí genetických faktorů a faktorů prostředí. Je pro ni typické zvýšení obsahu tuku v organismu, přičemž lipidy a jejich metabolity se ukládají nejen v tukové tkáni, ale i v dalších orgánech jako jsou játra, slinivka nebo sval (tzv. ektopické ukládání lipidů). Obezita je úzce spojena s metabolickým syndromem, který ve svém důsledku vede k rozvoji aterosklerózy, infarktu myokardu, mozkové mrtvice apod. Za patofyziologický podklad metabolického syndromu je považována inzulínová rezistence, vznikající mimo jiné v důsledku výše zmíněného ektopického ukládání lipidů. Inzulínová rezistence je v první fázi kompenzována hyperinzulinémií. Zvýšené koncentrace inzulínu nestačí však dlouhodobě normalizovat jeho účinku a nedostatečný účinek inzulínu vede k zvýšené glukoneogenezi a glykogenolýze v játrech a ke sníženému vychytávání glukózy ve svalové a tukové tkáni. Nedostatečná sekrece inzulínu slinivkou má za následek zvýšení koncentrace glukózy a vznik prediabetu a posléze diabetu 2. typu.

K dalším hlavním rysům obezity patří i jaterní steatóza. Je známo, že v játrech je syntetizována celá řada bílkovin a uvolňují se zde žlučové kyseliny, které napomáhají štěpení potravy. Jaterní buňka je schopna také ukládat zásobní látky, včetně lipidů. Při dlouhodobě zvýšené nabídce lipidů a nedostatečné kapacitě tukové tkáně pro jejich ukládání dochází ke vzniku jaterní steatózy. Jaterní steatóza je určitým obrazem inzulínové rezistence obézního pacienta spolupodílející se na rozvoji diabetu 2. typu.

V současné době v popředí zájmů vědecké veřejnosti zabývající se obezitou, resp. diabetes mellitus 2. typu stojí skupina nově identifikovaných fibroblastových růstových faktorů. Fibroblastové růstové faktory (FGF) jsou hormonální působky s mnohočetnými

biologickými funkcemi. Rodina FGF zahrnuje u lidí 22 členů (FGF 1 – 23). FGF 15 je znám pouze u myši, u lidí byl identifikován jako FGF 19.

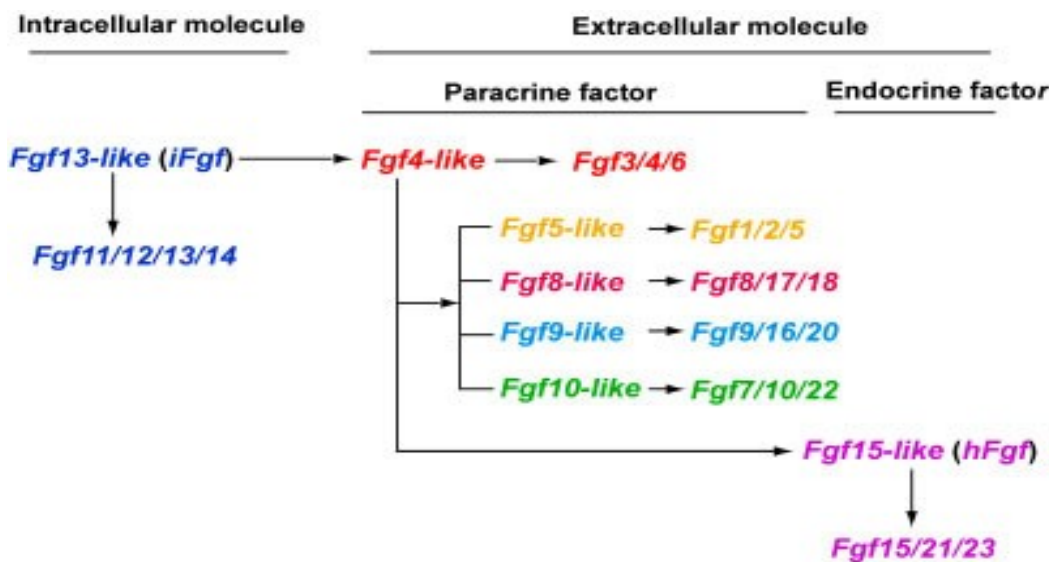
FGF lze rozdělit v závislosti na fylogenezi a sekvenční podobnosti do 7 podskupin a následně pak dle svého působení na 3 skupiny – intracelulární (FGF 11, 12, 13, 14), endokrinní (FGF 19, 21, 23) a kanonická (FGF 1, 2, 5; 3, 4, 6; 7, 10, 22; 8, 17, 18; 9, 16, 20) (Itoh and Ornitz 2004, 2008). Intracelulární a kanonické FGF byly identifikovány u obratlovců i u bezobratlých organismů. Působí jako lokální regulátory buněčného růstu a podílejí se na diferenciaci. Naopak podrodina FGF 19 zahrnuje FGF 19, FGF 21 a FGF 23, které byly identifikovány jen u obratlovců, kde působí endokrinně a prostřednictvím svého receptoru regulují fyziologické procesy. FGF 19 a FGF 21 jsou významné regulátory ovlivňující homeostázu glukózy a lipidů. FGF 19 řídí homeostázu žlučových kyselin a FGF 23 homeostázu fosfátů.

Tato bakalářská práce je zaměřena na FGF 19 a FGF 21, které jsou významnými metabolickými regulátory u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu. Shrnuty jsou současné poznatky o FGF 19 a FGF 21. Zvláštní důraz je kladen na otázku využití těchto faktorů v prevenci a léčbě obezity a diabetu 2. typu.

2. Evoluční vývoj - vznik podrodin FGF

Fibroblastové růstové faktory (FGF) jsou polypeptidy obsahující 150 – 300 aminokyselin. Mají konzervovanou strukturu o 120 aminokyselinách, která tvoří jádro proteinu, jež je na každém konci opatřeno C a N terminální doménou. Mezi členy FGF lze pozorovat 30 – 60-ti procentní identitu aminokyselin, jejíž příčinou je vývoj genomu (Itoh and Ornitz 2004).

Původní gen FGF rodiny je intracelulární faktor podobající se FGF 13 (FGF 13-like), z kterého vzniká genovou duplikací gen podobný FGF 4 (FGF 4-like), což je prekursor kanonické FGF podrodiny. Během genového vývoje FGF 4-like faktor získal štipitelnou sekreční signální sekvenci, která zajišťuje vznik kanonické podrodiny FGF. Tato podrodina má heparin vazebnou doménu a parakrinně se podílí na proliferaci a diferenciaci buněk. Prekurzorem endokrinní FGF podrodiny je rovněž FGF 4-like faktor, z kterého vzniká FGF 15/19-like faktor skrze lokální genovou duplikaci. FGF 15/19, FGF 21 a FGF 23 vznikly později během evolučního vývoje díky rozsáhlé genomové duplikaci. (Itoh and Ornitz 2004, 2008; viz. Obr. 1).



Obr. 1: Evoluční historie FGF genové rodiny u myši. Převzato z Itoh and Ornitz (2008)

Pozn. Pro člověka platí stejné schéma, ovšem FGF 15 značeno jako FGF 19.

3. Charakterizace FGF 19 a FGF 21 a jejich působení

3.1. Endokrinní působení FGF

Rozdíl mezi FGF 19 podrodinou a ostatními FGF spočívá v tom, že členové podrodiny FGF 19 obsahují intracelulární disulfidické můstky jako ostatní skupiny FGF, ale vykazují slabou afinitu k heparin sulfátu. Heparin sulfát je lokalizován v extracelulárním prostoru a díky tomu mohou tyto FGF přecházet z extracelulárních kompartmentů do oběhu a fungovat jako hormony (Goetz et al. 2007). Slabá afinita k heparin sulfátu vede k slabé vazbě mezi FGF a FGFRs (fibroblast growth factor receptors), proto tyto FGF potřebují kofaktor. Členové FGF 19 podrodiny asociují s transmembránovým Klotho proteinem, který usnadňuje interakci s FGFRs (obr. 2). Interakce mezi těmito faktory, specifickými receptory a Klotho proteinem jsou dostatečné pro spuštění metabolických, ale nikoliv mitogenních reakcí. Produkce Klotho proteinu přispívá k endokrinnímu chování FGF 19 podrodiny a omezuje jejich cílovou signalizaci na konkrétní tkáň (Goetz et al. 2007).

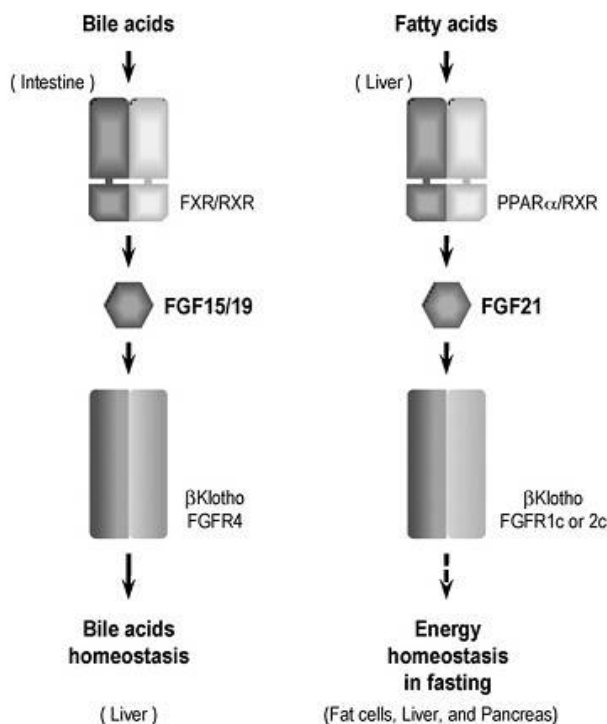
Jak bylo řečeno výše, signální kaskáda FGF je zprostředkována aktivací FGFRs. U člověka i u myši byly objeveny čtyři FGFR geny (FGFR1 – FGFR4). Tyto geny díky alternativnímu sestřihu, jenž zvyšuje funkční diverzitu, mohou kódovat sedm FGFR proteinů (FGFR 1c, 2c, 3c, 1b, 2b, 3b a 4), které zajišťují vazebnou specifitu k různým ligandům. FGFRs jsou receptory tyrozin kináz. Jsou tvořeny přibližně 800 aminokyselinami a obsahují extracelulární ligand vázající transmembránovou doménu a štěpitelnou intracelulární tyrozin kinázovou doménu (Itoh and Ornitz 2004). Navázání FGF na FGFRs spouští dimerizaci receptoru a následnou fosforylaci specifických cytoplasmatických tyrozinových zbytků, což vede k aktivaci odpovídající signální kaskády (FRS-2, MAPK, SHP-2, PI3K, STAT) (Dostálová et al. 2009).

FGF 19 a FGF 21 interagují s příslušnou FGFR izoformou pouze v případě, že je dostupný i β Klotho jako koreceptor. V přítomnosti β Klotho, FGF 21 silně interaguje s izoformou FGFR 1c a s menší afinitou s izoformou FGFR 2c. FGF 19 interaguje s FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4). S ostatními FGFR izoformami FGF 19 a FGF 21 neinteragují. (Goetz et al. 2007; Kurosu et al. 2007; Wu et al. 2009).

Exprese β Klotho v kombinaci s konkrétními FGFRs izoformami určuje tkáňově specifické metabolické aktivity FGF 19 a FGF 21. β Klotho je exprimovaný ve zvýšené míře v tukové tkáni, játrech a slinivce. FGF 19 působí proto převážně v játrech při biosyntéze

žlučových kyselin. FGF 21 působí v tukové tkáni, játrech a slinivce (Kurosu et al. 2007).

FGF 21 neaktivuje FGFR4, přestože je vysoce exprimovaný v játrech. Působí pouze prostřednictvím receptorů FGFR 1c a FGFR 2c. Naopak FGF 19 aktivuje FGFR4 v nebo bez přítomnosti β Klotho pravděpodobně důsledkem slabé afinity k heparin sulfátu (Wu et al. 2009, viz. Obr. 2).



Obr. 2: Mechanismus působení členů FGF 19 podrodiny. Modifikováno a převzato z Kurosu et al. (2009)

3.2. FGF 15/19

FGF 19 je nedávno charakterizovaný faktor FGF rodiny (Nishimura et al. 1999). Byl identifikován na základě znalosti aminokyselin již známých FGF díky analýze DNA databáze. Následně se zjistilo, že lidský FGF 19 je orthologem myšího FGF 15. Pouze u myši a potkanů byly tyto homologní geny pojmenovány FGF 15. U ostatních obratlovců byly nazvány FGF 19 (Itoh and Ornitz 2004).

FGF 15/19 je peptid tvořený 216 aminokyselinami (Nishimura et al. 1999), obsahující signální sekvenci tvořenou 22 aminokyselinami. Je lokalizován na chromosomu 11q13.3 (Itoh and Ornitz 2004). Prvotní studie ukázaly, že FGF 15/19 je exprimován výlučně v mozku plodu a podílí se tedy na embryogenezi (Nishimura et al. 1999). Později se zjistilo, že je

produkován hlavně terminální částí tenkého střeva (*ileum*) a jeho syntéza je regulována Farnesoidním receptorem X (FXR). FXR je nukleární receptor žlučových kyselin, který leží za prepisovanými oblastmi v genu FGF 19, konkrétně v druhém intronu. Přestože biosyntéza je ve střevě, FGF 19 působí převážně v játrech prostřednictvím svého receptoru FGFR4 a podílí se na regulaci syntézy žlučových kyselin a naplňování žlučníku (Holt et al. 2003).

U experimentálních modelů myši s FGF 15 knockoutem byl nalezen kontrahovaný žlučník. Naopak u myši bez knockoutu FGF 15 se zvětšoval objem žlučníku (Choi M et al. 2006). *In vitro* studie indikovaly, že FGF 15/19 vede k relaxaci hladkého svalstva ve žlučníku. Výsledky předešlých pokusů potvrzují, že FGF 15/19 působí jako systémový faktor regulující syntézu mastných kyselin v játrech, biosyntézu žlučových kyselin a plnění žlučníku.

FGF 19 je faktor podílející se na procesech zahrnujících cholesterol, lipoproteiny, triglyceridy a metabolismus glukózy (Tomlinson et al. 2002). Při zvýšené expresi u transgenních myši došlo ke snížení tělesné hmotnosti, zlepšení glukózové tolerance a inzulinové senzitivity a tyto myši byly rezistentní vůči dietou indukované obezitě (Tomlinson et al. 2002).

Jaterní syntéza žlučových kyselin je řízena enzymem cholesterol 7 α -hydroxylázou (Cyp7A1). Hladina tohoto enzymu u člověka během dne kolísá v závislosti na hladině FGF 19, který vykazuje diurnální rytmus řízený uvolňováním žlučových kyselin do střeva.

FGF 19 je uvolňován do cirkulace. Lundasen a spol. měřili změny FGF 19 v séru zdravých a štíhlých jedinců. Prokázali, že bazální hodnoty mohou vykazovat až 10-ti násobné variace a mohou být sníženy vlivem žlučových kyselin, resp. zvýšeny po podání chenodeoxycholové kyseliny (jedna ze žlučových kyselin). Kromě toho sérové hladiny FGF 19 vykazovaly výrazný diurnální rytmus s nejvyšším nárůstem 90 až 120 minut po jídle, kdy vzrostly i hladiny žlučových kyselin. Hladiny FGF 19 dosáhly vrcholu před sestupnou fází syntézy žlučových kyselin. Diurnální rytmus sérových hladin FGF 19 může být naopak potlačen hladověním (Lundasen et al. 2006).

3.3. FGF 21

FGF 21 je protein složený z 209 aminokyselin obsahující signální peptid o 28 aminokyselinách (Nishimura et al. 2000). Gen pro FGF 21 je lokalizovaný na chromozomu 19q13.33 (Itoh and Ornitz 2004). Tento faktor byl původně identifikován u myších embryí a u lidí pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) založené na homologním uspořádání

konzervovaných aminokyselin s FGF 19. Sekvence aminokyselin FGF 21 u lidí je vysoce homologní s myším FGF 21. Prokazuje přibližně 75% identitu (Nishimura et al. 2000). Lidský FGF 21 stejně jako FGF 19, byl identifikován na základě homologie v DNA databázi (Kharitonov et al. 2005). FGF 21 je typická FGF molekula s výraznou schopností stimulovat FGFR substrát 2α (FRS2 α), fosforylaci a aktivaci ERK 1/ 2 a Akt signalizující dráhy. Dále je důležité dodat, že tento faktor *in vitro* nevyvolává mitogenní odpověď, a to ani u senzitivních buněk, čímž se liší od ostatních FGF (Kharitonov et al. 2005).

Původní pokusy prokázaly, že FGF 21 je vysoce exprimován v játrech a méně intenzivně v thymu (Nishimura et al. 2000) dále v pankreatu, bílé tukové tkáni a svalech (Itoh 2010). Experimentální studie později prokázaly, že hlavním místem účinku FGF 21 je tuková tkáň, kde tento faktor působí jako stimulátor vychytávání glukózy skrze glukózový transportér typu 1 (GLUT1). GLUT1 se vyskytuje převážně v bílé tukové tkáni a jeho účinek není závislý na inzulinu (Kharitonov et al. 2005). Biosyntéza FGF 21 může být stimulována hladověním nebo vysokotukovou a nízkosacharidovou ketogenní dietou, jak bylo prokázáno u myši (Inagaki et al. 2007; Badman et al. 2007). Tato zjištění podnítila řadu výzkumů zabývajících se možností, že podávání by mohlo být využitelné při léčbě obezity a diabetes mellitus 2. typu.

4. Fyziologická úloha

4.1. FGF 15/19

4.1.1. Role FGF 15/19 v embryonálním stádiu

McWhirter a spol. uvádějí, že FGF 15 působí u myši na vývoj nervového systému a zdá se, že má význam v regulaci dělení buňky a embryonálním vývoji mozku, míchy a sensorických orgánů (McWhirter et al. 1997).

V *in vivo* studiích u myši s FGF 15 knockoutem bylo zjištěno, že většina těchto myši umírá po narození. Nejvíce z nich zemřelo těsně po porodu. V embryonálním stádiu byly pozorovány srdeční defekty, a následně bylo prokázáno, že FGF 15 je potřebný pro správnou morfogenezi srdečního traktu (Itoh 2010). Tyto pokusy ukazují, že FGF 15/19 má význam v růstu a diferenciaci srdce a mozku v embryonálním stádiu. Ačkoliv většina myši s knockout FGF 15 zemřela, některé myši přežily a vykazovaly normální fenotyp. Jaterní exprese cholesterol 7 α hydroxylázy (Cyp7A1) vzrostla u myších, které přežily, v důsledku nepřítomnosti FGF 15/19. Cyp7A1 katalyzuje první krok v biosyntéze žlučových kyselin. Exkrece fekálních žlučových kyselin vzrostla u FGF 15 knockoutovaných myši (Inagaki et al. 2005). Podobný fenotyp projevily také FGFR4 knockoutované myši (Yu et al. 2000).

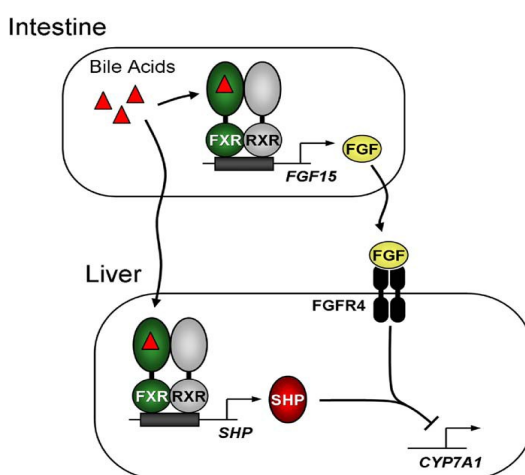
4.1.2. Působení FGF 19 v játrech při syntéze žlučových kyselin

Jak již bylo uvedeno výše, základní funkce FGF 19 je v játrech při syntéze žlučových kyselin. Jaterní syntéza žlučových kyselin je regulována enzymem cholesterol 7 α -hydroxylázou (Cyp7A1), jehož hladina u člověka během dne kolísá. Cyp7A1 katalyzuje první krok v biosyntéze žlučových kyselin (Holt et al. 2003). Žlučové kyseliny ovlivňují syntézu FGF 19 ve střevě. FGF 19 pak podle potřeby organismu zpětnovazebně reguluje syntézu žlučových kyselin v játrech (Inagaki et al. 2005, Lundasen et al. 2006). Enterohepatální cirkulace žlučových kyselin se podílí na důležitých fyziologických funkcích jako je homeostáza lipidů a také na zpětnovazebné regulaci inhibice syntézy žlučových kyselin. Syntéza žlučových kyselin je zpětnovazebně řízena žlučovými kyselinami, které se vracejí do jater přes enterohepatální oběh a potlačují aktivitu Cyp7A1 (Holt et al. 2003). V současné době pro utlumení účinku enzymu Cyp7A1 existují dva různé mechanismy fungující

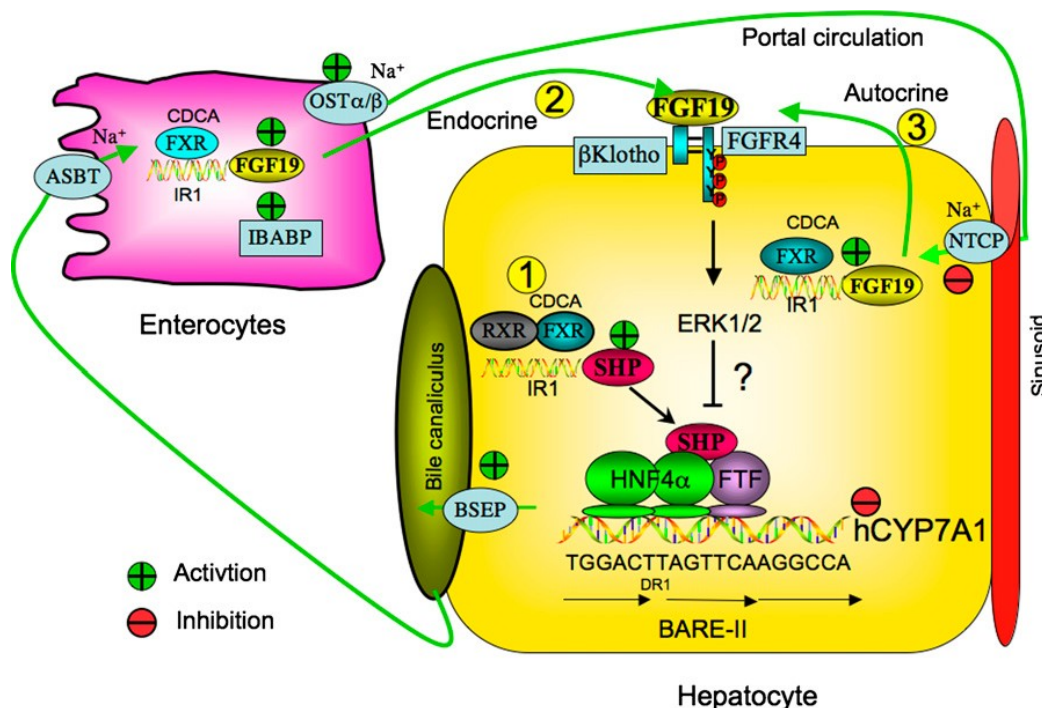
prostřednictvím jaderného receptoru FXR (farnesoid X receptor), který působí v jádře buněk a spouští expresi různých genů (obr. 3). FXR je zahrnut do níže uvedených mechanismů:

1. V játrech, žlučové kyseliny aktivují FXR, jenž indukuje nukleární malý heterodimer receptorového typu (SHP) (Obr. 3.). SHP nemá žádné DNA vazebné domény a je společným transkripčním represorem pro jaderné receptory mezi které patří např. LRH-1 (liver related homolog-1) nebo nukleární faktor hepatocytů 4 α (HNF4 α), se kterým interaguje a tím blokuje možné spolupůsobení mezi HNF4 α a PGC-1 α , což posléze vede k potlačení transkripce regulačních genů kódujících enzymy potřebné pro syntézu žlučových kyselin jako je např. Cyp7A1 (Zhang M et al. 2001) (viz níže obr. 3, obr. 4., dráha 1).

2. Holt a spol. (2003) jako první popsali, že FGF 19 je pod transkripční kontrolou FXR, který je umístěn za zahájením přepisované oblasti genu FGF 19. FGF 19 aktivuje jaterní FGFR4 signalizaci a tím inhibuje hladinu exprese Cyp7A1 mRNA v hepatocytech (Holt et al. 2003). Jiná studie potvrdila výše zmíněné poznatky, že žlučové kyseliny (ligandy) se ve střevě vážou na FXR, který indukuje syntézu FGF 15/19, jenž nepřímo koreluje s expresí Cyp7A1 mRNA v játrech (Inagaki et al. 2005). Výsledky toho experimentu označily FGF 15/19 jako enterohepatální signál pro regulaci syntézy žlučových kyselin. FGF 19 aktivuje jaterní FGFR4, který s represorem SHP potlačuje syntézu žlučových kyselin. Nicméně mechanismus, kterým FXR/FGF 19/FGFR4 dráha inhibuje Cyp7A1, zůstává zatím neznámý (Inagaki et al. 2005, viz obr. 3., obr. 4., dráha 2). Tato dráha ukazuje fyziologický mechanismus zpětnovazebné regulace syntézy žlučových kyselin.



Obr. 3: Model regulace syntézy žlučových kyselin pomocí FXR. Převzato z Inagaki et al. (2005)



Obr. 4: Regulační mechanismy enterohepatálního oběhu žlučových kyselin.

V játrech, žlučové kyseliny aktivují FXR, který spouští expresi SHP. SHP následně inhibuje LRH-1 (nebo lidské FTF) a HNF4α, což jsou aktivátory Cyp7A1 (FXR / SHP dráha 1). V endokrinní dráze žlučové kyseliny aktivují FXR, který vyvolá expresi FGF 19. FGF 19 může být transportován do jater, kde působí na jaterní FGFR4 (FXR/FGF 19/FGFR4 dráha 2). V autokrinní dráze cholestatické žlučové kyseliny mohou spustit FXR a následnou FGF 19/FGFR4 signalizaci, která uvede v činnost MAPK/ERK1/2 cestu, což vede k potlačení exprese Cyp7A1 (dráha 3). Převzato z Chiang (2009)

4.1.2.1. Autokrinní působení FGF 19

Z experimentálních studií vyplynulo, že žlučové kyseliny přímo regulují tvorbu FGF 19 v primárních lidských hepatocytech. CDCA (chenodeoxycholová kyselina) a GW4064 (agonista FXR) zvyšují expresi genu pro FGF 19, následnou sekreci FGF 19 a fosforylaci tyrosinu FGFR4, což vede k potlačení exprese Cyp7A1 mRNA v primárních lidských hepatocytech. Tato fakta potvrzují, že hepatocyty produkují FGF 19, který pomocí autokrinního nebo parakrinního mechanismu aktivuje FGFR4 signalizaci (Song et al. 2009).

Také bylo zjištěno, že nahrazení SHP pomocí siRNA neovlivňuje působení FGF 19 v inhibici exprese Cyp7A1 mRNA v primárních lidských hepatocytech, což prokazuje, že SHP nemusí být zapojen do FGF 19 signalizace (Song et al. 2009). Všechny tyto údaje svědčí pro

nepříliš významnou interakci mezi SHP a Cyp7A1 v autokrinním působení FGF 19, na rozdíl od interakce mezi SHP a Cyp7A1 v FXR / SHP dráze.

Z výše uvedených publikací vyplývá, že mechanismy působení FGF 19/FGFR4 v jaterních buňkách aktivují a fosforylují hlavně MAPK/ERK1/2 signální dráhy (obr. 4.). Otevřenou otázkou stále zůstává molekulární mechanismus zpětnovazebné inhibice Cyp7A1.

Endokrinní dráha může být fyziologickým mechanismem, kterým žlučové kyseliny zpětnovazebně inhibují syntézu žlučových kyselin, zatímco autokrinní cesta může být adaptivní odpověď na ochranu jater, aby v nich nedocházelo k nadměrnému hromadění žlučových kyselin.

Žlučové kyseliny a receptory těchto kyselin jsou terapeutické cíle pro vývoj léků na léčbu cholestatického onemocnění jater, jaterní steatózy, obezity a diabetes mellitus.

4.1.3. Potlačení syntézy mastných kyselin

Metabolický syndrom, pro který je typická obezita, hyperlipidemie, arteriální hypertenze a glukózová intolerance, lze do jisté míry ovlivnit snížením hladin volných mastných kyselin. K tomu snížení vede především pokles hmotnosti, zatímco farmakologické možnosti jsou spíše omezené.

Hepatické mastné kyseliny řídí syntézu triacylglycerolů, které se ukládají v játrech, krvi a tukové tkáni. Zvýšená syntéza mastných kyselin nebo jejich metabolitů v játrech, v důsledku sníženého působení inzulínu, může vést ke glukózové intoleranci, obezitě a diabetu. Inzulínová rezistence v játrech může snižovat syntézu glykogenu (glykogenezi) (Savage et al. 2007).

Inzulín je hormon produkováný β buňkami pankreatu, který stimuluje tvorbu mastných kyselin a expresi lipogenních enzymů v játrech. Dále ovlivňuje enzymy, které katalyzují glykolýzu (přeměnu glukózy na pyruvát) a glykogenezi (syntézu glykogenu) a potlačují glukoneogenezi (syntéza glukózy).

FGF 19 inhibuje činnost inzulínu, což vede k redukci exprese enzymů podílejících se na syntéze mastných kyselin (GK, L-PK, ATP-CL, ACC, FAS a SCD1). Jedná se především o enzym ACC, který působí jako inhibitor mitochondriální oxidace mastných kyselin.

FGF 19 může tímto mechanismem působit jako metabolický regulátor ukládání triacylglycerolů v játrech, resp. tukové tkáni a ovlivňovat glukózovou toleranci (Bhatnagar et al. 2009).

4.1.3.1. Mechanismus inhibice syntézy mastných kyselin

Dodnes byly identifikovány zatím dva mechanismy, kterými FGF 19 inhibuje syntézu mastných kyselin.

První mechanismus předpokládá, že FGF 19 predikuje změny v koncentraci SREBP-1c. SREBP-1c je hlavní transkripční aktivátor lipogenních genů (FAS, ATP-CL, SCD1 a S14) a je indukován inzulinem (Cagen et al. 2005). Tím, že FGF 19 inhibuje aktivitu inzulinu, redukuje koncentraci SREBP-1c, a tedy i expresi lipogenních enzymů.

Druhý mechanismus je nezávislý na změně koncentrace SREBP-1c. V tomto případě FGF 19 inhibuje inzulin a ten pak následně nestimuluje expresi glukokinázy (GK), která fosforyluje glukózu v prvním kroku glykolýzy v hepatocytech (Hansmannel et al. 2006).

4.1.3.1.1. Mechanismus závislý na SREBP-1c

V prvním mechanismu FGF 19 inhibuje aktivitu inzulinu, což výsledně vede k redukcii exprese SREBP-1c. SREBP-1c má v promotorové oblasti vazebná místa pro LXR (liver X receptor), Sp1 (specific protein 1) a NF-Y (nuclear factor Y). Tyto ligandy spolu interagují a vážou se do promotoru SREBP-1c, čímž aktivují jeho transkripci. Inzulin stimuluje FXR, který spouští transkripci SREBP-1c. Původní výzkumy předpokládaly, že FGF 19 potlačuje působení inzulinu, tedy i FXR a SREBP-1c (Cagen et al. 2005). Další výzkumy prokázaly, že FGF 19 nereguluje ani nepotlačuje stimulační efekt LXR. FGF 19 tedy neinhibuje expresi lipogenních genů pomocí modifikace v inzulinových signálních drahách. Naopak se zjistilo, že FGF 19 zvyšuje expresi genu STAT3, což je inhibitor transkripce genu SREBP-1c. Jako koaktivátor transkripce genu SREBP-1c působí PGC-1 β , jehož exprese je také snížena působením FGF 19 (Bhatnagar et al. 2009).

4.1.3.1.2. Mechanismus nezávislý na SREBP-1c

Druhý mechanismus vychází rovněž z faktu, že FGF 19 inhibuje aktivitu inzulinu. Tento model není závislý na koncentraci SREBP-1c, ale je založen na zjištění, že při podávání FGF 19 experimentálními zvířatům se zvyšuje exprese transkripčního represoru SHP. SHP potlačuje expresi lipogenních enzymů (Bhatnagar et al. 2009). SHP je obecný transkripční represor, který se váže přímo do promotorové oblasti a zamezuje expresi genů podílejících se na syntéze mastných kyselin (GK, L-PK, ACC a FAS) (Hansmannel et al. 2006). Nedávne

studie prokázaly, že inzulin indukuje transkripci genu GK, tím že aktivuje jaterní jaderný faktor 4 (HNF4), který se váže do promotoru genu GK. Další výzkumy prokázaly, že SHP interaguje s HNF4 a tím inhibuje jeho schopnost aktivovat transkripci GK, proto nedochází k přepisu GK a tedy ani k syntéze mastných kyselin. Interakce mezi SHP a HNF4 a jejich zapojení do inhibičního působení FGF 19 je nutno v budoucnu více prozkoumat.

Inhibiční efekt FGF 19 na inzulinem aktivovanou syntézu jaterních mastných kyselin by mohl tvořit mechanismus, který by mohl vysvětlit příznivý vliv FGF 19 na metabolický syndrom.

4.2. FGF 21

4.2.1. Působení v játrech

Savci mají velice dobře vyvinutý komplex metabolických odpovědí na hladovění. Primárním zdrojem energie v takovém případě jsou ketolátky, které vznikají čtenými přeměnami z mastných kyselin. Během hladovění je FGF 21 vylučován z jater a endokrinní cestou působí na bílou tukovou tkáň, kde vyvolává metabolickou adaptaci na hladovění. FGF 21 stimuluje lipolýzu v adipocytech, kde následně dochází k uvolnění neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA), které jsou transportovány do jater, kde jsou oxidovány na acetyl-CoA. Z acetyl-CoA se v hepatocytech syntetizují ketonové látky, které jsou hlavním energetickým zdrojem pro mozek během hladovění (Badman et al. 2007; Inagaki et al. 2007).

Po 12-ti hodinovém hladovění byla u myši pozorována 28krát vyšší hladina jaterní exprese FGF 21 než u myši s normálním dietním režimem. Tyto zvýšené hladiny FGF 21 byly po příjmu potravy sníženy na původní hladiny (před hladověním) (Inagaki et al. 2007).

Dlouholeté výzkumy prokázaly, že syntéza FGF 21 je částečně regulována PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor α). PPAR α je jaderný receptor aktivovaný mastnými kyselinami a je rozhodujícím receptorem v adaptaci na hladovění. PPAR α váže DNA elementy v podobě heterodimeru s retinoid X receptorem (RXR) a reguluje transkripci genů podílejících se na transportu a oxidaci mastných kyselin (Inagaki et al. 2007). Navíc, se PPAR α váže do promotorové oblasti genu FGF 21 a ovlivňuje jeho transkripci. Exprese FGF 21 v myších játrech a lidských hepatocytech je indukovaná přímo PPAR α během hladovění a reguluje adaptivní odpovědi na tento stav (obr. 5.).

V experimentálních pokusech založených na podávání PPAR α nebo jeho agonisty (GW7647) myším došlo k 25-ti násobnému zvýšení FGF 21 mRNA exprese v játrech. U

PPAR α deficitních myší byly bazální hladiny FGF 21 pětikrát nižší a při následném podání agonisty nedošlo k indukci FGF 21. Naopak hladověním se zvýšily hladiny FGF 21 pětikrát, což prokazuje, že FGF 21 je indukovaný během hladovění PPAR α , ale také dalšími cestami, do kterých není zapojen PPAR α (Inagaki et al. 2007).

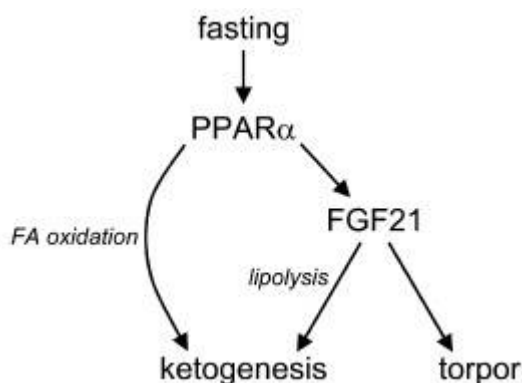
S ohledem na fenotypy, které vykazovaly transgenní FGF 21 myší, bylo zjištěno, že FGF 21 stimuluje lipolýzu v bílé tukové tkáni a indukuje ketogenezi v játrech (obr. 5.). Zvýšená produkce ketolátek může vést ke komatu a smrti, proto je ketogeneze úzce spojena s energetickými požadavky organismu. U těchto myší byla pozorována nižší hladina cholesterolu, glukózy a inzulinu (Inagaki et al. 2007).

V dalších experimentech bylo zjištěno, že podávání FGF 21 leptin-deficitním myším snížilo sérové hladiny glukózy, koncentraci triglyceridů, zvýšilo senzitivitu na inzulin a clearance glukózy. Myši se zvýšenou expresí FGF 21 v játrech byly rezistentní k obezitě vyvolané dietou (Kharitonov et al. 2005).

Podávání FGF 21 opicím s diabetes mellitus 2. typu vedlo ke snížení glukózy na lačno, triglyceridů, koncentrace inzulinu, LDL cholesterolu, váhového úbytku a zvýšení HDL cholesterolu (Dostálová et al. 2009).

V experimentu *in vivo* byla pomocí adenoviru potlačena jaterní exprese FGF 21 u myší krmených ketogenní dietou. U těchto myší bylo pozorováno zvětšení jater, lipémie a snížení ketolátek v krvi. Tyto vlivy byly patrně z části způsobené pozměněnou expresí klíčových genů v metabolismu lipidů a ketonů. Pro obnovení funkce jater (oxidace lipidů, clearance triglyceridů a ketogenezi) bylo nutné indukovat expresi FGF 21 změnou dietního režimu. (Badman et al. 2007).

Inagaki a spol. prokázali, že FGF 21 zvyšuje u myší torpor (obr. 5.), který je charakterizován sníženým fyzickým pohybem, lokomoční aktivitou, stavem strnulosti či krátkodobou hibernací, která udržuje energetické hladiny u malých savců. FGF 21 transgenní myši měly o 1–2 °C nižší bazální teplotu těla než normální myši. Během 24- hodinového hladovění vykazovaly transgenní myši torpor. Kontrolní myši tento stav nevykazovaly. Stejný fenotyp jako transgenní myši vykazovaly myši infikované adenovirem podporující expresi FGF 21 (Inagaki et al. 2007).



Obr. 5: Model koordinace PPAR α a FGF 21 během hladovění. Převzato z Inagaki et al.(2007)

4.2.2. Působení v tukové tkáni

FGF 21 je potenciální aktivátor vychytávání glukózy v myších diferencovaných 3T3-L1 buňkách a v lidských primárních adipocytech. V nediferencovaných 3T3-L1 buňkách a lidských primárních preadipocytech nepůsobí. Zhang a spol. (2008) zjistili, že během adipogeneze vzrůstá exprese FGF 21 mRNA v tukové tkáni. Nejvyšší bazální hladiny se projeví 5. den po diferenciaci buněk a 8. den po tomto procesu nastal ustálený stav, ve kterém byly hladiny FGF 21 pětikrát vyšší než u preadipocytů (Zhang et al. 2008).

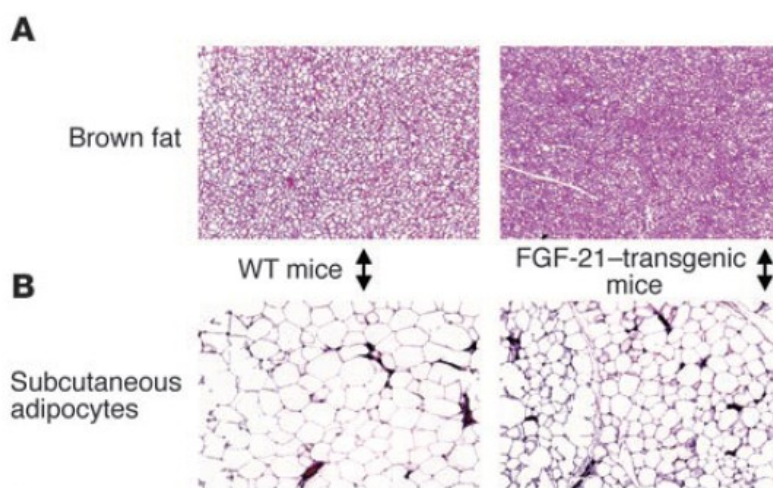
Účinky FGF 21 nejsou závislé na inzulinu a ani na látkách potřebných pro tvorbu inzulinu. Signifikantní odpověď organismu lze pozorovat přibližně po 4 hodinách působení FGF 21. Na rozdíl od inzulinu, který pracuje rychleji a vychytává glukózu v rozsahu minut. Působení FGF 21 je zprostředkováno změnami genové exprese GLUT1. FGF 21 působí skrze GLUT1 na rozdíl od inzulinu, který působí prostřednictvím GLUT4 transportér. Po přibližně 4 hodinách působení FGF 21 dochází k zvýšené expresi GLUT1 mRNA v bílé tukové tkáni, ale nikoli v játrech, svalech, ledvinách či mozku. U 3T3-L1 adipocytů stimulovaných FGF 21, byla detekována výrazná exprese různých forem FGFR 1 c a FGFR 2 c, což vede k domněnce, že jsou tyto receptory zahrnuty do FGF 21 signalizace – pouze během fáze diferenciaci adipocytů (Kharitonov et al. 2005). Toto tvrzení vyžaduje další experimentální výzkumy.

In vitro byla zkoumána mitogenicitá FGF 21, V 3T3-L1 adipocytech ani v dalších primárních buňkách nebyly pozorovány žádné mitogenní nebo proliferální účinky, ani po přidání heparinu (Kharitonov et al. 2005).

V pokusu, ve kterém byly 3T3-L1 adipocyty vystaveny účinku FGF 21 a PPAR γ agonisty (rosiglitazon) po dobu 72 hodin, došlo k značnému navýšení exprese GLUT1 a stimulaci transportu glukózy (Moyers et al. 2007). Dále bylo prokázáno, že rosiglitazon indukuje FGF 21 nejen v 3T3-L1 adipocytech, ale také v tukových buňkách izolovaných z podkožní tukové tkáně lidí (Zhang et al. 2008).

Pro zjištění působení FGF 21 *in vivo*, byly generovány transgenní myši se zvýšenou expresí FGF 21, které ve stáří 2 měsíců vykazovaly stejný fenotyp jako standardní myši. V 9. měsíci tyto myši vážily mnohem méně než kontrolní skupina. Transgenní myši také měly prokazatelně nižší hodnotu glukózy v lačném stavu, méně tuku v játrech, lepší clearance glukózy a zlepšenou citlivost na inzulin. Navíc, u transgenních myši se zachovalo větší množství hnědé tukové tkáně a podkožní adipocyty se vyvinuly do menších rozměrů, než jaké demonstrovaly standardní myši (obr. 6). Transgenní myši konzumovaly dvakrát více potravy než normální myši, ale nepřibraly na váze, což dokazuje, že při zvýšené expresi FGF 21 jsou hlodavci rezistentní k obezitě indukované dietou. Patrně by mohl být tento jev způsoben zvýšenou aktivitou hnědé tukové tkáně. Potvrzení této teorie vyžaduje budoucí výzkumy.

Neméně důležité je zmínit, že FGF 21 neprokazoval žádné známky mitogeneze, hypoglykémie nebo navýšení váhy v kterékoliv testované dávce u diabetických nebo zdravých zvířat nebo při zvýšené expresi u transgenních myši.



Obr. 6: Histologická analýza FGF 21 transgenních myši vs. WT myši. (A) Barvení hnědé tukové tkáně prokazující vyšší intenzitu hnědého tuku u FGF 21 transgenních myši v porovnání s WT myši. (B) Barvení podkožní tukové tkáně ukazující menší adipocyty u FGF 21 transgenních myši v porovnání s WT myši. Pozměněno a převzato z Kharitonov et al.

4.2.3. Působení v pankreatu

FGF 21 byl detekován u lidí, potkanů a myší v pankreatických ostrůvkách. U potkanů také v izolovaných β buňkách. FGF 21 stimuluje expresi mRNA inzulinu, ale ne sekreci inzulinu indukovanou glukózou v izolovaných pankreatických ostrůvkách u zdravých potkanů. U diabetických myší byla po podávání FGF 21 pozorována zvýšená sekrece inzulinu a také větší obsah inzulinu v ostrůvkách slinivky. FGF 21 nepůsobí na proliferaci buněk v pankreatu, ale pravděpodobně zachovává funkci a životaschopnost β buněk, protože je prostřednictvím ERK 1/2 a Akt signalizujících drah chrání před apoptózou (Wente et al. 2006). FGF 21 exprese se výrazně zvyšuje v myších pankreatických buňkách během cureleinem indukované pankrititidy a následujícímu stresu *in vitro*. Cureleinem indukovaná pankrititida nepřímo korelovala s FGF 21, protože transgenní myši vykazovaly snížení hladin séra amylázy a snížení pankreatických buněčných aktivací. Naopak u FGF 21 knockoutovaných myší byly zjištěny zvýšené sérové amylázy a tkáňové poškození (Johnson et al. 2009). Zdá se, že FGF 21 působí jako bezprostřední odpověď genu ochraňujícího pankreatické ostrůvky od zjevného poškození.

5. Klinické studie

V současné době je velmi málo známo o změnách FGF 19 a FGF 21 u lidí. Je pouze několik prací, které se zabývají FGF se vztahem k obezitě, resp. diabetes mellitus 2. typu a to jak na úrovni cirkulujících koncentrací, tak na úrovni mRNA exprese v různých tkání. Do jaké míry mohou být tyto hladiny ovlivněny dietním režimem u morbidně obézních žen, bylo popsáno např. v pracích Mráz et al.

5.1. FGF 19

Na III. interní klinice VFN v Praze byly u pacientek s obezitou a diabetes mellitus 2. typu stanoveny hladiny FGF 19 v séru po 3 měsíčním léčení PPAR α agonistou (fenofibrát), resp. po nízko-kalorické dietě (VLCD) po dobu 3 týdnů. Získané výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou zdravých štíhlých žen. Před zahájením studie byly obézní, diabetičky a kontroly zváženy, změřeny a byly stanoveny základní biochemické parametry. Krev na stanovení hladiny FGF 19 byla odebrána na lačno mezi 7-8 hod. K stanovení FGF 19 byla použita komerční ELISA souprava od firmy Biovendor, ČR.

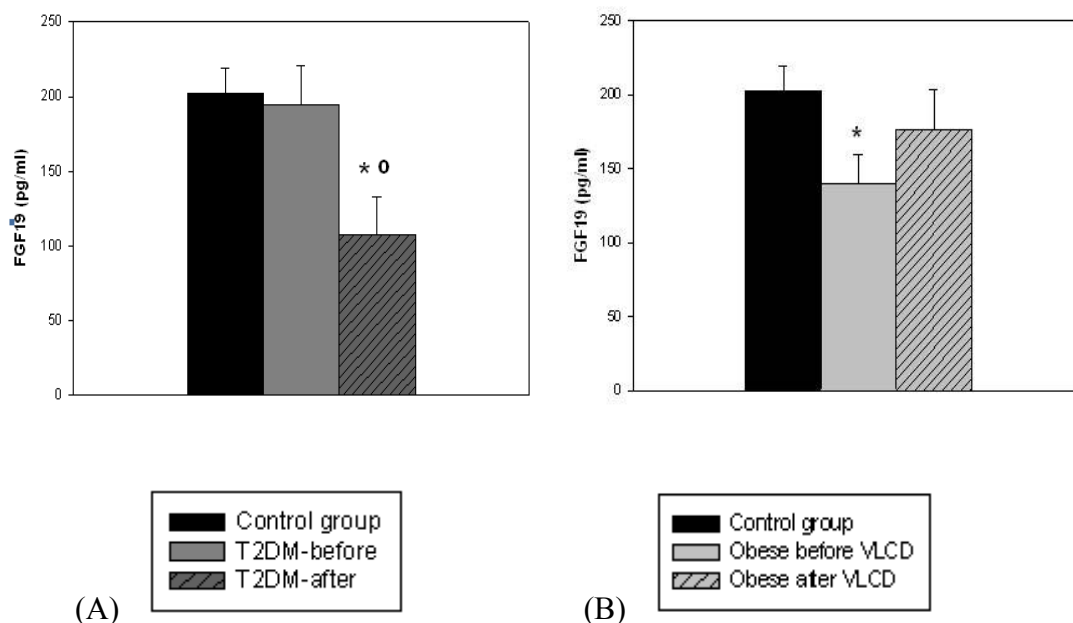
Obézní s T2DM měly signifikantně nižší hladiny FGF 19 v porovnání se štíhlými ženami. Sérové hladiny FGF 19 se nelišily mezi obézními bez T2DM a kontrolní skupinou. Hodnoty BMI, krevní glukózy, HOMA indexu, triglyceridů, leptinu a inzulinu byly vyšší u obézních bez i s T2DM v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak hladiny adiponectinu v séru byly signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace cholesterolu se mezi skupinami nelišily. Při porovnání obézních a diabetiček byly zjištěny u diabetiček signifikantně nižší koncentrace leptinu a BMI a naopak značně vyšší hladiny triglyceridů, krevní glukózy, inzulinu a HOMA indexu.

Obézní ženy bez T2DM po 3- týdenní VLCD vykazovaly nižší BMI a HOMA index, snížené hladiny inzulinu, krevní glukózy a leptinu. V koncentracích cholesterolu, triacylglycerolů a adiponectinu, nedošlo k žádným změnám. Také byla pozorována tendence k vyšším sérovým koncentracím FGF 19 (obr. 7., B).

U žen s T2DM vedla 3 měsíční léčba pomocí fibrátu k signifikantní redukci FGF 19 (obr. 7., A) triacylglycerolů, zatímco glukóza, HOMA index a glykovaný hemoglobin výrazně vzrostly. Také se snížila inzulinová senzitivita hodnocená pomocí HOMA indexu.

Z korelační analýzy vyplynulo, že FGF 19 negativně koreluje s BMI a pozitivně s adiponectinem. U obézní a kontrolní skupiny navíc pozitivně koreluje s leptinem. Také bylo

prokázáno, že FGF 19 nezávisí na věku, hladinách glukózy, triglyceridů, inzulinu a HOMA indexu. Lze říci, že FGF 19 je jen z části ovlivněn nutričním stavem a hmotností pacienta (Mráz et al. 2011).



Obr. 7: Hladiny FGF 19 (A) u diabetické skupiny léčené fenofibrátem, (B) u obézní skupiny po VLCD. Převzato z Mráz et al. (2011)

* versus kontroly, 0 versus obézní

5.2. FGF 21

Ve studii Zhang a spol. (2008) byly zkoumány hladiny séra FGF 21 u obézních a diabetických pacientů a byly analyzovány souvislosti mezi FGF 21 a metabolickým syndromem. Naměřené hodnoty FGF 21 byly výrazně zvýšené u obézních pacientů (bez ohledu na pohlaví) a korelovaly s kardiometabolickými rizikovými faktory, protože pacienti s hypertenzí také vykazovaly zvýšené hladiny FGF 21 (Zhang et al. 2008).

Provedené korelační analýzy prokázaly pozitivní asociaci mezi FGF 21 a některými parametry obezity jako je např. BMI, obvod pasu, poměr pas-boky a procentuální zastoupení tuku. Procentuální zastoupení tuku pozitivně korelovalo u nediabetických subjektů, u diabetiků nebyla asociace prokázána. Dále byla identifikována negativní korelace mezi FGF 21 a adiponectinem, A-FABP a HDL.

Zhang a spol. (2008) prokázali, že FGF 21 je asociován se zvýšeným rizikem metabolického syndromu, neboť skupina pacientů s metabolickým syndromem projevovala zvýšené hladiny FGF 21. Tento progresivní nárůst FGF 21 souvisí se vrůstajícími komponenty metabolického syndromu. Výsledky studie prokazují, že FGF 21 je spojen s metabolickým syndromem dohromady s BMI a sérovými hladinami A-FABP. Zhang a spol. (2008) navrhli, že vysoké hladiny séra FGF21 jsou rizikovým faktorem pro metabolický syndrom u lidí.

Klinická studie provedená na III. interní klinice VFN v Praze prokázala podobné výsledky jako Zhang a spol. (2008). Navíc hodnotili změny FGF 21 po redukčním režimu a po léčbě fenofibráty. Bylo prokázáno, že 3- týdenní velmi nízko-kalorická dieta (VLCD) a léčba PPAR α agonistou (fenofibrátem) po dobu 3 měsíců signifikantně zvýšila cirkulující hladiny FGF 21 v porovnání s bazálním stanovením (Mráz et al. 2009). Kromě sérových koncentrací FGF 21 byla měřena i mRNA exprese FGF 21 v tukové tkáni u obézních s BMI > 40 a štíhlých žen. V subkutánní tukové tkáni nebyly zjištěny rozdíly mezi obézními a štíhlými, což je v rozporu s výsledky studie Zhang a spol. (2008), kde byly prokázány signifikantní rozdíly v FGF 21 mRNA expresi v podkožní tukové tkáni. Naopak ve viscerální tukové tkáni byla mRNA exprese FGF 21 významně vyšší u obézních v porovnání se štíhlými. Pro posouzení produkce FGF 21 v játrech a působení v tukové tkáni s ohledem na cirkulující hladiny, byla měřena FGF 21 mRNA exprese v játrech. FGF 21 exprese v játrech byla mnohonásobně vyšší než v tuku, což potvrzuje fakt, že játra zůstávají nejvíce důležitým producentem toho faktoru u lidí (Zhang et al. 2008, Mráz et al. 2009).

Získané výsledky jsou v souladu s prací (Inagaki et al. 2007), kteří uvádějí až 25- ti násobný nárůst hladiny FGF 21 mRNA v játrech u myší po hladovění a léčbě PPAR α agonistou (Inagaki et al. 2007).

Zvýšené hladiny FGF 21 u obézních pacientů po VLCD by mohly být interpretovány jako odpověď na hladovění. Tří týdenní VLCD snížila tělesnou hmotnost obézních a zlepšila jejich inzulinovou senzitivitu. Zvýšené hladiny FGF 21 po VLCD mohou mít pozitivní efekt při redukci hmotnosti. Dále léčba diabetických pacientů pomocí PPAR α agonisty (fenofibrát) sice zvýšila hladinu FGF 21 na podobnou úroveň jako u pacientů po VLCD, ovšem nedošlo ke změně citlivosti na inzulin. Je paradoxní, že po léčbě fenofibrátem byla naopak mírně zhoršena kompenzace diabetes mellitus 2. typu, což je v rozporu s výsledky, které uvedl Kharitonov a spol. (2005) v pokusech na myších. Jisté nejasnosti mohly být způsobeny

relativně nízkým počtem pacientů ve studii, nebo mohlo dojít k ovlivnění výsledků skrze nástroje na měření inzulinové senzitivity (Mráz et al. 2009).

6. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se na základě recentních literárních zdrojů pokusila shrnout dosavadní poznatky o působení a změnách FGF 19 a FGF 21 v organismu. Z dostupné literatury jsem zjistila, že FGF19 a FGF 21 jsou multifunkční metabolické regulátory. FGF 19 se podílí na biosyntéze žlučových a mastných kyselin. FGF 21 je nový metabolický faktor produkovaný přednostně v játrech, dále v bílé tukové tkáni a pankreatu. V těchto kompartmentech se podílí na regulaci metabolismu lipidů a glukózy.

Hlavní pozornost proto byla věnována sérovým koncentracím FGF 19 a FGF 21 u obézních a diabetických pacientů a snaze postihnout změny hladin těchto faktorů po léčbě fenofibrátem a po nízko-kalorické dietě. U zvířat (myši) FGF 21 projevuje terapeutické charakteristiky pro efektivní léčbu složek metabolického syndromu zahrnujících diabetes melitus 2. typu a obezitu, ovšem u lidí zatím nelze aplikovat, i když dietní zásah by mohl být možnou léčbou metabolického syndromu. V současné době jsou známy dílčí skutečnosti o metabolismu FGF 21 a 19 v lidském organismu. Do budoucna bude potřeba nejen dalších experimentálních investic, ale také dalších klinických výzkumů, aby se podařilo objasnit funkci těchto biologických regulátorů.

7. Seznam zkratek

ACC	acetyl-CoA carboxylase
A-FABP	adipocyte fatty acid-binding protein
Akt	protein kinase B
ATP-CL	ATP-citrate lyase
BMI	body mass index
CDCA	chenodeoxycholic acid
CYP7A1	cholesterol 7 α -hydroxylase
ERK 1/ 2	extracellular signal regulated kinase 1/ 2
FAS	fatty acid synthase
FGF	fibroblast growth factor
FGF 15	fibroblast growth factor 15
FGF19	fibroblast growth factor 19
FGFRs	fibroblast growth factor receptors
FGFR 1c	fibroblast growth factor receptor 1c
FGFR 2c	fibroblast growth factor receptor 2c
FGFR 4	fibroblast growth factor receptor 4
FRS-2	fibroblast growth factor substrate 2
FXR	farnesoid X receptor
FTF	α -fetoprotein transcription factor
GK	glucokinase
GLUT1	glucose transporter 1
GLUT4	glucose transporter 4
HDL	high density lipoprotein
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α
LDL	low density lipoprotein
L-PK	L-pyruvate kinase
LXR	liver X receptor
LRH-1	liver related homolog-1
MAPK	mitogen activated protein kinase
NF-Y	nuclear factor Y
PCR	polymerase chain reaction
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α

PI3K	fosfatidylinositol 3-kinase
PPAR α	peroxisome proliferator activated receptor α
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor γ
RXR	retinoid X receptor
S14	spot 14
SCD1	stearoyl-CoA desaturase-1
SHP	small heterodimer partner
Sp1	specificity protein 1
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein-1c
STAT 3	signal transducer and activator of transcription 3
T2DM	type 2 diabetes mellitus
VLCD	very low caloric diet
WT	wild type

8. Seznam použité literatury

- Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E (2007) Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism* 5: 426–437
- Bhatnagar S, Damron HA, Hillgartner FB (2009) Fibroblast Growth Factor-19, a Novel Factor That Inhibits Hepatic Fatty Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 284: 10023–10033
- Cagen LM, Deng X, Wilcox HG, Park EA, Raghow R, Elam MB (2005) Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochemical Journal* 385:207–216
- Chiang JYL (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research* 50:1955–1966
- Choi M, Moschetta A, Bookout AL, Peng L, Umetani M, Holmstrom SR, Suino-Powell K, Xu HE, Richardson JA, Gerard RD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2006) Identification of hormonal basis for gallbladder filling. *Nature Medicine* 12:1253–1255
- Dostálová I, Haluzíková D, Haluzík M (2009) Fibroblast Growth Factor 21: A Novel Metabolic Regulator With Potential Therapeutic Properties in Obesity/Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 58:1–7
- Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, Kalinina J, Olsen SK, Aliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Zhang F, Linhardt RJ, Yu X, White KE, Inagaki T, Kliewer SA, Yamamoto M, Kurosu H, Ogawa Y, Kuro-o M, Lanske B, Razzaque MS, Mohammadi M (2007) Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology* 27:3417–3428
- Hansmannel F, Mordier S, Iynedjian PB (2006) Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. *Biochemical Journal* 399: 275–283
- Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Kliewer SA, Goodwin B, Jones SA (2003) Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes and Development* 17:1581–1591
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *CELL METABOLISM* 2:217–225

Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2007) Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metabolism* 5:415–425

Itoh N, Ornitz DM (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* 20:563–569

Itoh N, Ornitz DM (2008) Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental Dynamics* 237:18–27

Itoh N (2010) Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 342:1–11

Johnson CL, Weston JY, Chadi SA, Fazio EN, Huff MW, Kharitonov A, Köster A, Pin CL (2009) Fibroblast Growth Factor 21 Reduces the Severity of Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *137*:1795–1804

Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of Clinical Investigation* 115:1627–1635

Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M (2007) Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 282:26687–26695

Kurosu H, Kuro-o M (2009) The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299: 72–78

Lundasen T, Galman C, Angelin B, Rudling M (2006) Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J. Intern. Med.* 260: 530–536

McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, Murre C (1997) A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Development* 124:3221–3232

Moyers JS, Shiyanova TL, Mehrbod F, Dunbar JD, Noblitt TW, Otto KA, Reifel-Miller A, Kharitonov A (2007) Molecular Determinants of FGF-21 Activity-Synergy and Cross-Talk With PPAR γ Signaling. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 210:1–6

Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, Michalsky M, Kasalicky M, Haluzikova D, Matoulek M, Dostalova I, Humenanska V, Haluzik M (2009) Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical Endocrinology* 71:369–375

Mraz M, Lacinova Z, Kavalkova P, Haluzikova D, Trachta P, Drapalova J, Hanusova V, Haluzik M (2011) Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR- α agonist treatment. *Physiol Res*, v tisku

Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N (1999) Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1444:148–151

Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1492:203–206

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI (2007) Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiol Rev* 87: 507–520

Song KH, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JYL (2009) Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology* 49(1): 297–305

Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D, Stewart TA (2002) Transgenic Mice Expressing Human Fibroblast Growth Factor-19 Display Increased Metabolic Rate and Decreased Adiposity. *Endocrinology* 143(5):1741–1747

Wente W, Efanov AM, Brenner M, Kharitonov A, Köester A, Sandusky GE, Sewing S, Treinies I, Zitzer H, Gromada J (2006) Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic-Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes* 55:2470–2478

Wu X, Li Y (2009) Role of FGF19 induced FGFR4 activation in the regulation of glucose homeostasis. *Aging* 1:1023–1027

Zhang M, Chiang JYL (2001) Transcriptional Regulation of the Human Sterol 12 α -Hydroxylase Gene (CYP8B1). *The Journal of Biological Chemistry* 276: 41690–41699

Zhang M, Yeung DCY, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, Wong RLC, Chow WS, Tso AWK, Lam KSL (2008) Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes* 57:1246–1253

Zhou G, Moyers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation* 108:1167–1174